

141205

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : 2 669 929
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : 91 15031

(51) Int Cl³ : C 07 K 3/20, 15/04; G 01 N 33/569

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 04.12.91.

(30) Priorité : 04.12.90 US 621845.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 05.06.92 Bulletin 92/23.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : Le rapport de recherche n'a pas été
établi à la date de publication de la demande.

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : Société dite: QUIDEL
CORPORATION — US.

(72) Inventeur(s) : Pronovost Allan D., Pawlak Jan W. et
Condon, Kristy S.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Lavoix.

DOC

(54) Composition d'antigènes, procédé de détection de *Helicobacter pylori* à l'aide de cette composition et nécessaire la contenant.

(57) On décrit une composition d'antigènes sensible et spécifique pour la détection de *Helicobacter pylori* dans des échantillons biologiques. La composition utilise divers antigènes obtenus par chromatographie, par exclusion due à la taille, de cellules de *H. pylori* solubilisées par un détergent. On décrit également des essais sérologiques tels que des essais immuno-enzymatiques ELISA, d'agglutination de latex et immuno-enzymatiques rapides, utilisant la composition d'antigènes améliorés, et un nécessaire pour utilisation dans ces essais sérologiques.

FR 2 669 929 - A1



La présente invention concerne une composition d'antigènes pouvant déceler la présence d'anticorps spécifiques contre Helicobacter pylori. En particulier, elle concerne un mélange d'antigènes isolés par chromatographie, par exclusion due à la taille, d'antigènes de H. pylori solubilisés à l'aide de détergents. L'invention concerne également un procédé et un nécessaire pour la détection de la présence des anticorps spécifiques de H. pylori.

Helicobacter pylori (connu précédemment sous le nom de Campylobacter pylori), une bactérie qui colonise l'estomac humain, a été découvert en 1983, comme décrit par B.J. Marshall et coll. dans Lancet (1984), I:1311-1314. L'association de H. pylori avec des troubles gastriques, tels que la gastrite active chronique, les ulcères gastrique et duodénal et la dyspepsie non ulcéreuse, a suscité beaucoup d'intérêt dans le milieu médical spécialisé en gastro-entérologie.

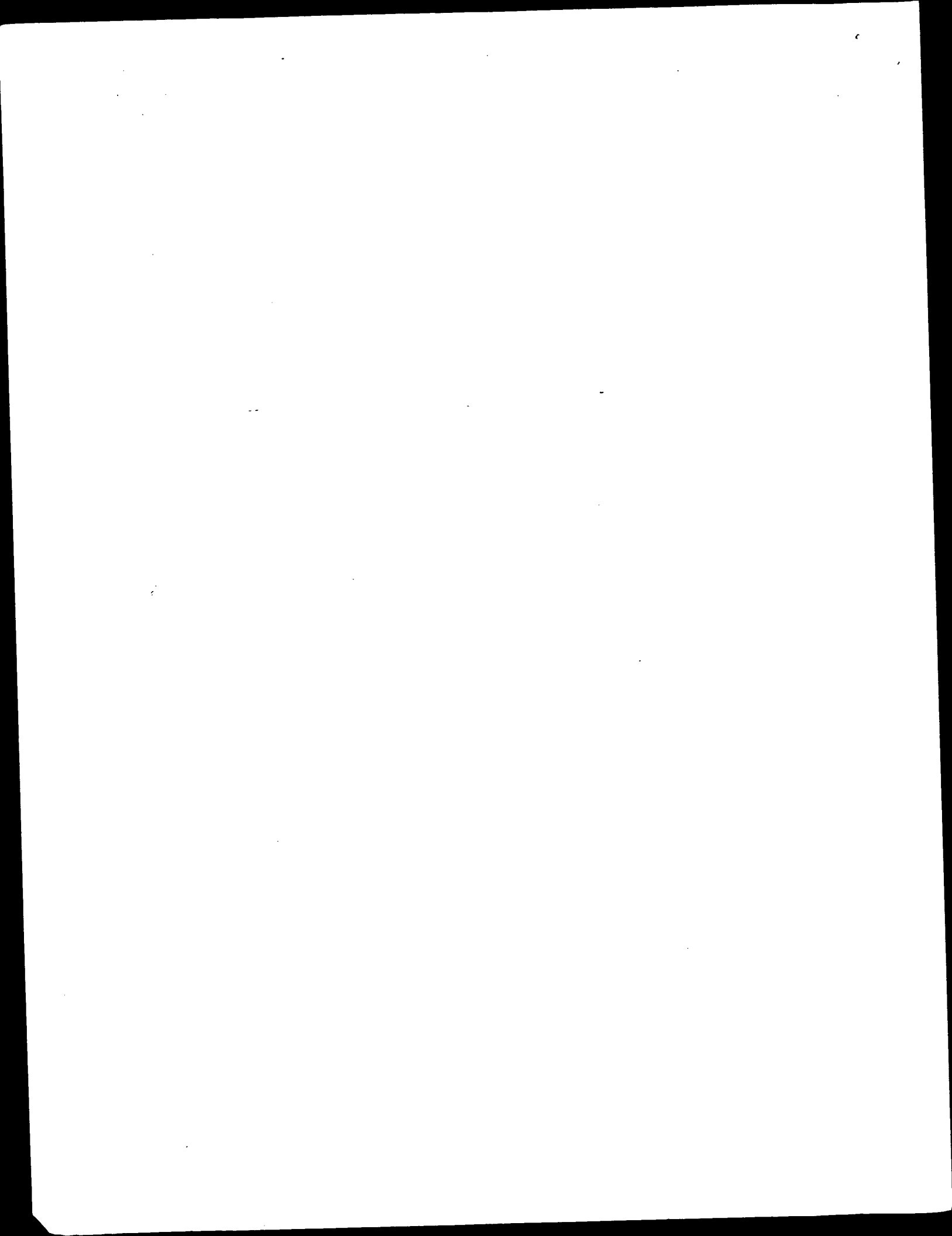
Le rôle précis de H. pylori dans les ulcères gastro-duodénaux n'a pas encore été élucidé. Néanmoins, sa relation avec les troubles gastriques a été la cause d'efforts notables consacrés à la mise au point de procédés pour la détection de l'organisme dans l'estomac humain. La détection peut être réalisée de deux façons: (1) directement, par examen d'une biopsie de l'estomac par une méthode histologique ou par une méthode d'isolement de cultures cellulaires,

ou les deux; ou (2) indirectement, par examen d'un échantillon de sérum de sang périphérique pour la détermination d'anticorps circulants dirigés contre H. pylori. Le faible coût et la simplicité (à la fois pour le patient et pour le praticien) de la seconde méthode sérologique la rend particulièrement attrayante.

L'exactitude d'un examen sérologique pour la détection d'anticorps dirigés contre H. pylori dépend de la nature de la composition antigénique qui se lie aux anticorps. Les compositions utilisées dans les essais actuels vont d'organismes entiers intacts à une substance hautement purifiée consistant en une molécule antigénique essentielle.

H. Von Wulffen [Campylobacter pylori, p. 157-163, Menge et coll. éditeurs, Springer-Verlag (1988)] a utilisé des lysats de cellules bruts de H. pylori pour déceler la présence d'infections chez des patients atteints de gastrite. EP-A-0 329 570 (M.J. Blaser) révèle que de tels lysats de cellules bruts peuvent être utilisés pour déceler des anticorps contre H. pylori. Des extraits de H. pylori par la glycine acide ont été utilisés en tant que préparations antigéniques dans des essais immuno-enzymatiques (ELISA), comme décrit par C.S. Goodwin et coll., J. Infectious Diseases (1987), 155:488-494. Des compositions d'antigènes de surface et des compositions d'uréase ainsi que des extraits par la glycine acide ont été utilisées pour l'examen de sérums de patients atteints de gastrite, dans F.J. Bolton et coll., J. Clin. Pathol. (1989), 42:723-726.

Ces compositions brutes ont de nombreux inconvénients. L'utilisation d'organismes entiers ou de lysats bruts est fréquemment la cause de problèmes de spécificité d'un examen sérologique. La présence d'une certaine quantité de substance indésirable dans la composition peut provoquer la fixation "non spécifique" d'autres anticorps, de sorte que des sujets dépourvus d'anticorps spécifiquement dirigés contre H. pylori donneront un résultat "faussement positif" de l'essai. Des



faux positifs peuvent également apparaître lorsque la composition contient des antigènes également possédés par d'autres organismes apparentés à H. pylori. Les individus infectés par ces organismes peuvent produire des anticorps à réaction croisée avec la composition de H. pylori. Ainsi, une composition préférée est enrichie en antigènes spécifiques d'espèce, hautement réactifs, et ne contient pas d'importantes quantités à réaction croisée d'antigènes également possédés par des organismes apparentés.

10 Un autre inconvénient des préparations brutes est que fréquemment elles ne décèlent pas la présence d'anticorps spécifiques de H. pylori. Ces résultats "faussement négatifs" d'examens peuvent être obtenus lorsque: (1) une substance antigénique spécifique de H. pylori n'est pas aisément disponible pour la liaison à l'anticorps, en raison d'interactions avec d'autres composants dans la composition; (2) le procédé de préparation altère la substance antigénique spécifique de H. pylori, de sorte que celle-ci est moins réactive avec des anticorps; ou (3) une substance antigénique spécifique de H. pylori est trop fortement diluée par la présence de substance indésirable.

25 A l'autre extrémité de l'éventail de compositions d'antigènes, la demande PCT publiée sous le n° WO 89/09407 décrit le diagnostic d'infections provoquées par H. pylori, au moyen d'une composition à base d'uréase de H. pylori purifiée. H. pylori contient une uréase spécifique d'espèce qui peut être utilisée en sérodiagnostic. D'autres compositions utilisant une substance produite à partir d'un gène unique cloné de H. pylori peuvent également être utilisées; voir par exemple D. Chevrier et coll., J. Clin. Micro. (1989), 27:321-326.

35 L'utilisation de compositions d'antigènes uniques purifiés ou de produits géniques clonés élimine certaines des causes des résultats erronés indiqués ci-dessus. Cependant, l'utilisation d'une composition de gène cloné peut introduire

des molécules de sous-produits de systèmes d'expression qui peuvent encore donner des résultats faussement positifs de l'essai. De plus, des compositions de gènes hautement purifiés ou clonés peuvent produire l'antigène concerné en une structure altérée, non native, qui est moins réactive avec les anticorps, ce qui donne des résultats faussement négatifs de l'essai.

En outre, l'analyse western blot a montré que des individus infectés produisent caractéristiquement des anticorps dirigés contre H. pylori, qui reconnaissent plusieurs antigènes. Une composition contenant une molécule antigénique unique purifiée ou un seul produit génique purifié limite inutilement la portée de la reconnaissance d'anticorps et peut donner des résultats faussement négatifs pour des individus infectés ne comportant pas ou comportant peu d'anticorps dirigés contre l'antigène particulier utilisé.

US-A-4 882 271 (Evans et coll.) décrit un procédé pour l'obtention d'une composition antigénique qui se situe entre les extrêmes ci-dessus: elle ne contient qu'un petit nombre de composants antigéniques majeurs ayant des masses moléculaires comprises entre 300 000 et 700 000 daltons. On obtient la composition d'Evans en recueillant les fractions d'une séparation chromatographique par exclusion due à la taille, dans une plage définie de masses moléculaires élevées, ayant une nette activité de l'enzyme uréase. Evans suggère que bien qu'une purification plus poussée ne soit pas nécessaire, le degré de purification des compositions décrites est nécessaire pour obtenir dans les essais une sensibilité et une spécificité adéquates.

Les individus infectés par H. pylori répondent en fait à plusieurs antigènes différents. Nos propres recherches ont montré que des essais plus sensibles et plus spécifiques pour la détection d'anticorps dirigés contre H. pylori peuvent être élaborés à l'aide des techniques d'extraction et de purification telles que décrites ici, pour l'obtention d'une

composition supérieure d'antigènes de H. pylori, ayant un plus large spectre d'antigènes réactifs et spécifiques de H. pylori, qui étaient inconnus jusqu'à présent.

La figure 1 représente la courbe caractéristique de fractionnement d'un extrait par le n-octyl- β -glucopyrannoside (BOG) d'antigènes de H. pylori sur une colonne de Sepharose 6FF, et l'activité d'uréase de fractions réunies.

En conséquence, un objet de la présente invention est de fournir une composition antigénique comprenant un mélange d'antigènes provenant de cellules de H. pylori solubilisées par un détergent, et qui est capable de déterminer la présence ou l'absence d'une infection par H. pylori dans un échantillon biologique avec un plus grand degré d'exactitude et de fiabilité qu'il n'était possible jusqu'à présent.

Un autre objet de la présente invention est de fournir une composition antigénique pour la détermination de la présence d'infection par H. pylori, cette composition portant au maximum le taux de réponse positive lorsque l'infection est présente, en réduisant au minimum la quantité de résultats faussements négatifs, ce qui améliore la sensibilité de l'essai. De même, la composition porte au maximum le taux de réponses négatives lorsque l'infection est absente, en réduisant au minimum la quantité de résultats faussement positifs, ce qui améliore la spécificité de l'essai.

Encore un autre objet de la présente invention est de fournir un procédé pour la détermination de la présence d'une infection par H. pylori dans un échantillon biologique, avec un rapport "signal/bruit" maximum, au moyen d'une composition d'antigènes enrichie ayant un large spectre d'antigènes hautement réactifs, spécifiques de H. pylori.

Encore un autre objet de la présente invention est de fournir un nécessaire à utiliser pour déterminer la présence d'une infection par H. pylori dans un échantillon biologique, avec un rapport "signal/bruit" maximum.

La description ci-après fera apparaître d'autres objets, avantages et nouvelles caractéristiques de l'invention, qui apparaîtront également au spécialiste par la mise en pratique de l'invention.

5 Sous un aspect de la présente invention, on fournit une composition comprenant des antigènes purifiés provenant de protéines de Helicobacter pylori associées au cellules, les antigènes ayant des masses moléculaires allant d'environ 16 000 à 120 000 daltons, telles que déterminées par analyse
10 par électrophorèse en gel de polyacrylamide-dodécylsulfate de sodium avec réduction (SDS-PAGE), et ayant une activité diminuée d'uréase.

 Sous un autre aspect de la présente invention, on fournit une composition comprenant des antigènes purifiés provenant de protéines de Helicobacter pylori associées aux cel-
15 lules, la composition étant obtenue par culture de cellules de Helicobacter pylori dans un bouillon additionné de 10 % de sérum fœtal bovin, et récolte des cellules lorsque la croissance en phase logarithmique a commencé à décliner; solubilisation des cellules dans une solution salée tamponnée au
20 phosphate (STP) contenant environ 1 % de n-octyl- β -D-glucopyrannoside, pendant au moins environ 30 minutes, pour l'obtention d'une solution de protéines cellulaires; dialyse pendant une nuit de la solution de protéines cellulaires contre
25 de la STP, puis centrifugation de la solution à une vitesse moyenne, pour l'obtention d'un surnageant; introduction du surnageant dans une colonne 6FF (Pharmacia) de chromatographie par exclusion due à la taille; élution de la colonne à l'aide d'un tampon Tris 50 mM contenant 0,025 % d'azoture de
30 sodium, et collecte des fractions éluées; exclusion du pic de protéines à masses moléculaires élevées, contenant la majorité de l'activité uréase; et réunion des fractions restantes de protéines à faibles masses moléculaires, privées d'uréase.

 Sous un autre aspect de la présente invention, on four-
35 nit un procédé pour la détection d'infection par Helicobacter pylori dans un échantillon biologique, le pro-

5 cédé comprenant: la mise en contact avec l'échantillon d'une composition comprenant des antigènes purifiés provenant de protéines de Helicobacter pylori associées aux cellules, obtenues par les procédés mentionnés plus haut, pour la formation d'un complexe d'incubation; et l'essai du complexe d'incubation pour déterminer la présence de complexes anticorps-antigènes indiquant la présence d'infection par Helicobacter pylori.

10 Sous encore un autre aspect de la présente invention, on fournit un nécessaire à utiliser dans la détection d'infection par Helicobacter pylori dans un échantillon biologique, le nécessaire comprenant des antigènes purifiés provenant de protéines de Helicobacter pylori associées aux cellules, obtenues par les procédés mentionnés plus haut.

15 Les "antigènes" de la présente invention sont des "protéines associées aux cellules" extraites de cellules de Helicobacter pylori. Les "protéines associées aux cellules" comprennent des protéines associées aux membranes externes et des protéines de surface. Il est possible d'extraire hors de
20 cellules de H. pylori des protéines associées aux cellules, sans détruire les cellules, au moyen de détergents non ioniques tels que le n-octyl- β -D-glucopyrannoside (BOG) et d'autres détergents remplissant la même fonction. Ces protéines associées aux cellules sont capables de déclencher une
25 réponse immunitaire sous la forme d'anticorps qui reconnaissent des déterminants antigéniques sur ces protéines.

Par l'expression "échantillon biologique", telle qu'on l'utilise ici, on entend un échantillon de sang, sérum sanguin, plasma, extrait de lymphes ou autre extrait provenant
30 d'un patient humain, à tester pour déceler la présence d'une infection par H. pylori.

Telle qu'on l'utilise ici, l'expression "fractions protéiques à masses moléculaires élevées contenant de l'activité d'urée", désigne des fractions chromatographiques ayant une
35 absorbance importante à 280 nm et contenant des protéines à

masses moléculaires généralement supérieures à 300 000 daltons (telles que déterminées par chromatographie par perméation de gel) et manifestant une importante activité d'uréase. Telle qu'on l'utilise ici, l'expression "fractions protéiques à faibles masses moléculaires, privées d'uréase" désigne des fractions à faibles masses moléculaires ayant une absorbance marquée à 280 nm et une activité d'uréase diminuée.

Telle qu'on l'utilise ici, l'expression "activité d'uréase diminuée" désigne une activité spécifique inférieure à 0,34 unité de DO_{550}/A_{280} , telle que mesurée dans l'essai d'hydrolyse d'urée catalysée par l'uréase, décrit dans l'exemple 2.

Les compositions d'antigènes de la présente invention sont des protéines associées aux cellules provenant de cellules de H. pylori. Les cellules sont solubilisées à l'aide d'un détergent non ionique, et le surnageant résultant est soumis à une chromatographie sur colonne par exclusion due à la taille, suivie de la réunion des fractions sélectionnées élues de la colonne. Les fractions réunies de la présente invention ne comprennent pas les fractions comportant la majeure partie de l'activité manifeste de l'enzyme uréase. Par contre, un certain nombre de fractions contenant des antigènes à faibles masses moléculaires, privées d'activité uréase, sont réunies pour donner la composition finale.

Les antigènes de la présente invention peuvent être préparés de plusieurs façons. Dans un mode de réalisation préféré, on prépare les antigènes par culture d'organismes appartenant à l'espèce H. pylori, dans un milieu de croissance tel que le bouillon pour culture de Brucella. Le bouillon contient des compléments nutritifs. Un complément préféré est le sérum fœtal bovin. On met les cellules à incuber dans des flacons secoués sur un agitateur rotatif, dans une atmosphère composée de CO_2 , O_2 et N_2 . On récolte les cellules par centrifugation à vitesse moyenne, après que la croissance en phase logarithmique a commencé à décliner. On peut également

cultiver les cellules de H. pylori par étalement, comme par exemple sur des plaques de gélose au sang, suivi de récolte.

Une fois les cellules de H. pylori récoltées, elles peuvent être lavées, puis mises en suspension dans un tampon pour la solubilisation. Dans un mode de réalisation préféré, le tampon de solubilisation est une solution salée tamponnée au phosphate (STP) contenant un détergent non ionique. Les détergents non ioniques comprennent des produits de réaction d'oxyde d'éthylène ou d'oxyde de propylène avec: (1) des alkyl(C_6-C_{22})-phénols ou (2) des alcools aliphatiques primaires ou secondaires, linéaires ou ramifiés. D'autres détergents non ioniques comprennent des oxydes d'amines tertiaires à longues chaînes, des oxydes de phosphines tertiaires à longues chaînes et des dialkylsulfoxydes. Dans un mode de réalisation préféré, le détergent non ionique est le n-octyl- β -D-glucopyrannoside ajouté à une concentration de 0,1-3,0 % (p/v), encore mieux de 1,0 %.

Les cellules de H. pylori lavées sont mises en suspension dans environ 0,1 à 10 ml du tampon de solubilisation, pour 100 mg de poids humide de cellules, encore mieux dans environ 1 ml de tampon de solubilisation pour 100 mg de poids humide de cellules. Cette suspension est mise à incuber et agitée pendant au moins environ 30 minutes à la température ambiante. La suspension résultante de cellules solubilisées est dialysée contre de la STP, habituellement pendant une nuit, et le surnageant est recueilli par centrifugation à vitesse moyenne.

On soumet ensuite le surnageant résultant à une séparation en fonction de la taille, habituellement une chromatographie sur colonne par exclusion due à la taille. Dans un mode de réalisation préféré, on injecte le surnageant dans une colonne d'exclusion due à la taille (6FF, Pharmacia) et ensuite on l'élue à l'aide de tampon Tris 50 mM (pH 8,0) contenant environ 0,025 % d'azoture de sodium. On recueille ensuite les fractions et on contrôle l'absorbance à 280 nm

ainsi que l'activité d'uréase, pour déterminer les profils de fractionnement.

On rejette les fractions protéiques à masses moléculaires élevées, contenant la majeure partie de l'activité d'uréase, et on réunit les fractions restantes à faibles masses moléculaires, privées d'uréase. L'ensemble constitue l'extrait d'antigènes de la présente invention. L'extrait est constitué d'antigènes ayant des masses moléculaires inférieures à 200 000 daltons, plus particulièrement allant d'environ 16 000 à environ 120 000 daltons, telles que déterminées par SDS-PAGE. Dans un mode de réalisation préféré, on prépare cet extrait en réunissant les fractions 34-52 comme indiqué sur la figure 1.

Divers essais sérologiques peuvent être utilisés dans la présente invention pour la détection d'anticorps dirigés contre H. pylori dans des échantillons biologiques. Des essais bien caractérisés tels que les essais immuno-enzymatiques (ELISA), les essais à écoulement rapide, les essais par agglutination de latex, les essais par immunoblotting et les essais immunologiques à écoulement latéral sont tous envisagés dans la présente invention.

Dans un mode de réalisation préféré, on effectue l'essai sérologique par la méthode de microtitrage EIA (essai immuno-enzymatique). Dans cette méthode, on revêt les puits de plaques de microtitrage avec les compositions de la présente invention, décrites plus haut, et on met à incuber pendant une nuit à 4°C. On élimine ensuite la solution de la composition et on sèche les puits pendant 2 heures à 37°C. On prépare ensuite des échantillons biologiques à tester, à diverses dilutions dans de la STP contenant de l'albumine de sérum bovin (ASB) et on les introduit dans les puits. Après 30 minutes d'incubation à 25°C, on élimine l'échantillon biologique et on lave les puits avec de la STP contenant le détergent Tween 20. On ajoute ensuite une préparation d'anticorps de lapin conjugué à une enzyme, qui reconnaît l'immuno-

globuline G humaine ("anti-IgG humaine"), et on met de nouveau les puits à incuber. On élimine à nouveau la solution et on effectue un autre lavage avec de la STP et du Tween 20. On ajoute enfin une solution contenant un substrat pour l'enzyme
5 conjuguée.

Si des anticorps humains dirigés contre H. pylori sont présents dans l'échantillon biologique, les anticorps anti-IgG humaine de lapin se fixent au puits et l'enzyme conjuguée réagit avec le substrat et produit un changement de
10 coloration qui reflète la quantité d'anticorps présents. Dans un mode de réalisation préféré, l'enzyme est la peroxydase de raifort, et le substrat est le 2,2'-azino-bis(acide 3-éthylbenzthiazoline-sulfonique) (ABTS).

Un autre essai immunologique est l'essai EIA à écoulement rapide, qui ressemble à l'essai de microtitrage EIA mais utilise une composition d'antigènes adhérent à une membrane poreuse de Nylon. On place ensuite la membrane de Nylon sur un tampon absorbant et on l'insère dans un support en matière
15 plastique exposant la membrane. On dilue l'échantillon biologique et on le fait s'écouler à travers la membrane. On fait ensuite s'écouler à travers la membrane les anticorps anti-IgG humaine de lapin conjugués à une enzyme, suivis d'une solution de lavage. On ajoute enfin une solution contenant le substrat pour l'enzyme conjuguée, et un changement de
20 coloration est produit comme dans la méthode ELISA.

Dans l'essai par agglutination de latex, la composition d'antigènes est fixée à des perles de latex. On met ensuite l'échantillon biologique à incuber directement avec les particules de latex sur une lame porte-objet. Au bout d'une
30 courte durée, on examine le mélange réactionnel pour déterminer la présence de particules de latex agglutinées ou réticulées, indiquant la présence d'anticorps dirigés contre des antigènes de H. pylori.

La présente invention englobe également un nécessaire
35 contenant une composition d'antigènes décrite plus haut. Le

nécessaire peut alors être utilisé pour mettre en œuvre les procédés de la présente invention décrits ici.

Dans un mode de réalisation préféré, le nécessaire contient une composition d'antigènes préparée comme décrit plus haut et fixée ensuite sur un support solide, pour utilisation dans un essai sérologique.

La présente invention est illustrée par les exemples descriptifs et non limitatifs ci-après.

Exemple 1

10 Méthodes de culture et d'extraction

Culture de H. pylori

On a utilisé du bouillon pour culture de Brucella (Difco Laboratories) additionné de sérum fœtal de veau, en tant que milieu de croissance pour la culture de H. pylori à 15 35°C sous une atmosphère composée de CO₂, O₂ et N₂. On a ensemencé un échantillon de 20 ml de milieu de croissance avec 1 ml de culture de base de H. pylori congelée, on l'a mis à incuber et on l'a transféré dans une culture de 1 litre mis à incuber pendant 48-72 heures jusqu'à une densité de 20 cellules de 8 à 10 x 10⁷ UFC (unités formant colonies) par ml. On a récolté les cellules par centrifugation à vitesse moyenne, on les a lavées avec de l'eau désionisée puis tassées par centrifugation à vitesse moyenne, pour obtenir 1x10⁶ cellules par mg de culot de cellules humides.

25 Extrait de cellules de H. pylori obtenu par sonication

La préparation d'un extrait d'antigènes provenant de H. pylori par sonication était similaire à celle décrite par Perez-Perez et coll. dans Ann. Int. Med., 109:11 (1988). Après la récolte initiale de cellules par centrifugation à 30 vitesse moyenne, on a lavé trois fois les cellules avec une solution salée isotonique stérile. Le culot de cellules final a été mis en suspension à une concentration de 10 mg (poids humide) de cellules par ml d'eau désionisée. On a caractéristiquement soumis à une sonication une suspension de 10 à 35 15 ml, en refroidissant en bain de glace, à l'aide d'un appa-

reil de sonication Sonic Dismembrator Model 300 (Fisher Scientific Co., Pittsburgh, PA, USA) avec augmentations brusques d'amplitude de 2 minutes à l'émission maximale de puissance à la micropointe. Le produit de sonication résultant a été congelé à -70°C , puis décongelé et centrifugé
5 comme décrit plus haut. On a recueilli le surnageant et on a évalué la teneur en protéines par lecture de l'absorbance à 280 nm.

Extrait de cellules de *H. pylori* par la glycine

10 La préparation d'un extrait d'antigènes par la glycine acide était similaire à celle décrite pour *C. jejuni* dans Blaser et Duncan, Infect. Immun., 44:292 (1984). Après une récolte initiale par centrifugation à vitesse moyenne, on a lavé les cellules à trois reprises avec une solution salée
15 isotonique stérile, et on les a mises en suspension à 25°C dans un tampon glycine-HCl 0,2 M (pH 2,2), à une concentration de 10 mg (poids humide) de cellules dans 1 ml de tampon. Au bout de 15 minutes, on a à nouveau centrifugé la suspension de cellules. Le surnageant a été conservé et dialysé
20 pendant une nuit contre de l'eau froide, à l'aide d'un tube à seuil de coupure de 12-14 kilodaltons. On a recueilli le rétentat et on a évalué la teneur en protéines par lecture de l'absorbance à 280 nm.

25 Extraction de cellules de *H. pylori* par le n-octyl- β -glucopyrannoside (BOG)

Dans un essai type, on a récolté une culture de *H. pylori* par centrifugation à vitesse moyenne et on a lavé deux fois les cellules par mise en suspension dans de l'eau désionisée stérile, suivie d'une centrifugation. Le culot de
30 cellules final a été mis en suspension à une concentration de 100 mg/ml dans une solution salée tamponnée au phosphate (STP) contenant de l'azoture de sodium et 1 % (p/v) de n-octyl- β -glucopyrannoside (BOG) et mis à incuber pendant 30 minutes à 25°C . La suspension a été dialysée pendant une
35 nuit à 4°C à l'aide d'un tube à seuil de coupure de 12-

14 kilodaltons, contre de la STP contenant de l'azoture de sodium, puis centrifugée à vitesse moyenne. On a recueilli le surnageant et on a déterminé la teneur en protéines de l'extrait par mesure de l'absorbance à 280 nm.

Exemple 2

5

Préparation et analyse d'extrait d'antigènes de H. pylori par BOG

On a injecté l'extrait de BOG, décrit ci-dessus, dans une colonne de résine Sepharose 6FF (Pharmacia) équilibrée dans du tampon tris-HCl 50 mM (pH 8,0) contenant 0,025 % (p/v) d'azoture de sodium. On a recueilli 70 fractions (représentant chacune 2 % du volume de la colonne) et on les a contrôlées par mesure de l'absorbance à 280 nm. Un profil de fractionnement type de l'extrait de BOG est représenté sur la figure 1.

Le profil de fractionnement sur la figure 1 révèle cinq composants discernables: (1) le groupe A (fractions 17-19 y compris), représentant le premier pic à masse moléculaire élevée et ayant une activité négligeable d'uréase de H. pylori; (2) le groupe B (fractions 20-33) associé à un "creux de pic" et ayant la majeure partie de l'activité de l'uréase; (3) le groupe C (fractions 34-52) contenant des protéines à faibles masses moléculaires, privées d'uréase; (4) le groupe D (fractions 53-58) représentant la pente descendante du second pic de protéines; et enfin (5) le groupe E (fractions 59-63) représentant la traînée du second pic, à faible masse moléculaire.

On a analysé les fractions en effectuant une SDS-PAGE avec réduction sur gels de 0,15 x 12 x 15 cm [12 % p/v d'acrylamide - 0,32 % (p/v) de N,N-méthylène-bisacrylamide] en présence de 0,1 % (p/v) de SDS. On a injecté en même temps que les échantillons de fractions des étalons de protéines à masses moléculaires élevées et à faibles masses moléculaires (BioRad Labs). L'électrophorèse a été effectuée à 25 mA/plaque (gel empilé) ou à 40 mA/plaque (gel coulant),

jusqu'à migration du colorant marqueur bleu de bromophénol jusqu'à l'extrémité inférieure du gel (2,5-3 heures). Les gels ont été ensuite colorés pendant 60 minutes dans 0,2 % (p/v) de bleu brillant de Coomassie R250 dissous dans 50 % (v/v) de méthanol, 10 % (v/v) d'acide acétique, et finalement décolorés dans 50 % (v/v) de méthanol, 10 % (v/v) d'acide acétique.

L'analyse par SDS-PAGE avec réduction des fractions réunies A-E (définies plus haut), obtenues après fractionnement sur Sepharose 6FF de l'extrait par BOG de cellules de *H. pylori* indique une plage d'enrichissement eu égard aux antigènes communs et aux antigènes spécifiques de *H. pylori*, comme indiqué dans le tableau 1. Sur les gels de PAGE avec réduction, les antigènes à masses moléculaires élevées (PM > 200 000) des groupes A et B apparaissent sous forme de bandes à faibles masses moléculaires (PM < 120 000) par suite de la digestion et de la réduction requises pour la SDS-PAGE.

Tableau 1

	PM (kd) de l'antigène Spécifique de <i>H. pylori</i>	Groupe				
		A	B	C	D	E
20	120	-	-	2*	-	-
	66	1	2	4	-	-
	62,59	-	-	3	0,5	-
	52	-	-	2	1	-
	31	0,5	2	3	1	-
25	<u>Commun</u>					
	89,73	-	-	2	-	-
	56	2	2	4	3	2
	45,42	-	0,5	2	0,5	0,5
	29,25	-	0,5	3	0	1
30	21,16	-	2	2	2	1

* Intensité relative sur l'échelle 1-4 (maximum).

Le tableau 1 indique que le groupe C est relativement enrichi en antigènes spécifiques de *H. pylori*.

On a déterminé l'activité d'uréase dans chaque fraction, en utilisant une modification de la méthode de Mobley et coll., Infect. Immun. (1986), 54:161-169, qui comprend la mesure de la variation de pH provoquée par l'ammoniac engendré par l'hydrolyse de l'urée catalysée par l'uréase. On a
5 ajouté 50 µl de chaque fraction à 780 µl de tampon pour substrat d'uréase [urée 10 mM, tampon phosphate de sodium 4,5 mM (pH 6,8), 70 µg/ml de rouge de phénol] et on a mis le mélange à incuber pendant 30 minutes à la température ambiante. On a
10 ensuite mesuré la densité optique de parties aliquotes de 100 µl à 550 nm au moyen d'un lecteur de plaque de microtitrage modèle MR 700 (Dynatech Laboratories). L'activité d'uréase spécifique a été exprimée par le rapport DO_{550}/A_{280} . La figure 1 représente le profil à 280 nm d'un fractionnement sur Sepharose 6FF d'un extrait BOG, et l'activité spécifique
15 d'uréase des groupes B et C.

Exemple 3

Comparaison du groupe B, du groupe C et d'autres antigènes

Dans cet exemple, on a comparé le groupe B, contenant
20 la majeure partie de l'activité de l'uréase (fractions 20-33) et le groupe C privé d'uréase (fractions 34-52), en ce qui concerne l'aptitude à déceler des anticorps IgG anti-H. pylori dans des sérums humains, comme décrit ci-dessous.
Echantillons de sérums de patients

25 Dans des cliniques de gastro-entérologie, on a recueilli des échantillons de sérum et de plasma sur des sujets qui étaient caractérisés soit comme H. pylori-positifs, soit comme H. pylori-négatifs, en fonction des résultats culturels et histologiques de biopsies gastriques.
30 Les échantillons ont été en outre caractérisés par des signes gastro-intestinaux diagnostiqués cliniquement.
Essai immuno-enzymatique d'antigènes de H. pylori par écoulement rapide

35 L'élément en phase solide consistait en un tampon absorbant placé dans une gaine à fond moulé, suivi de 6,45 cm²

de rayonne 8S et d'une membrane en Nylon Biodyne A de 1,2 μ m. On a déposé sur la membrane en Nylon un extrait de H. pylori dilué dans une solution de dépôt d'antigènes, suivi d'IgG humaine dilué dans de la STP contenant de l'azote de sodium. Les membranes ont été bouchées pendant 30 minutes à la température ambiante avec une solution d'ASB alkylée, et ensuite séchées pendant 10-20 minutes à 45°C. On a placé une gaine supérieure moulée sur la membrane en Nylon traitée, la zone ayant reçu l'antigène se trouvant au centre de la partie visible, et on l'a soudée aux ultrasons. Un assemblage de pré-filtres a été inséré dans les unités soudées, placé dans un sac en feuille métallique contenant un desséchant, puis scellé à chaud.

Mode opératoire pour l'essai immuno-enzymatique à écoulement rapide

Au moyen d'un dispositif de distribution capillaire de 30 μ l, on a placé un échantillon provenant d'un patient (sérum ou plasma) dans une cuvette en matière plastique avec 150 μ l de diluant pour échantillon. On a introduit l'échantillon dilué dans le dispositif d'essai décrit plus haut, et on l'a laissé s'écouler complètement à travers le filtre. On a ensuite ajouté de l'anticorps anti-IgG humaine de lapin conjugué à de la phosphatase alcaline, et on l'a laissé à nouveau s'écouler complètement à travers le filtre. Le filtre a été lavé avec 0,5 ml de solution de lavage et on a introduit dans la cartouche 210 μ l d'une solution de 3-indoxyl-phosphate (un substrat chromogène). Après incubation pendant 5 minutes, on a lavé complètement la membrane pour mettre fin à l'essai. Les résultats de l'essai immunologique ont été ensuite interprétés dans les 15 minutes suivantes, à l'aide des critères suivants:

UN RESULTAT NEGATIF était indiqué par l'apparition d'une barre négative bleue au centre de la membrane. UN RESULTAT POSITIF était indiqué par l'apparition d'un cercle bleu plein superposé sur la barre négative témoin sur la mem-

brane. L'absence à la fois de la barre bleue et du cercle bleu plein indiquait que l'essai était ininterprétable, et qu'il fallait le répéter.

Qualification du groupe C de l'extrait d'antigènes de
 5 H. pylori pour la détection d'anticorps dirigés contre
H. pylori dans des sérums humains

On a appliqué l'essai immuno-enzymatique rapide sur
 différentes compositions d'antigènes, pour déterminer la fré-
 quence de résultats faussement positifs sur des échantillons
 10 de sérum humain. Les extraits d'antigènes utilisés étaient:
 les groupes A et C de l'extrait d'antigènes par BOG; et les
 extraits par la glycine et obtenus par sonication, préparés
 comme décrit plus haut. Les résultats sont donnés dans le
 tableau 2.

15

Tableau 2

Echantillons de sérums H. pylori-négatifs
(confirmés par examens culturels et histologiques)

		Culture/ histologie	Groupe C	Groupe A	Glycine	Sonication
20	<u>Echantillon</u>					
	4	-	-	+	+	+
	6	-	-	+	-	+
	7	-	-	-	+	+/-
	8	-	+/-	+	+	+/-
25	10	-	+/-	+	+	+/-
	13	-	-	+/-	-	+/-
	14	-	-	+	-	-
	15	-	-	+	-	-
	16	-	-	+/-	-	+
30	22	-	+/-	+/-	-	+/-
	32	-	-	+	+/-	+/-
Résultats fausse-						
ment positifs, %:		0	14	77	41	59

Echantillons de sérums *H. pylori*-positifs
(confirmés par examens cultureux et histologiques)

		<u>Culture/</u>				
	<u>Echantillon</u>	<u>histologie</u>	<u>Groupe C</u>	<u>Groupe A</u>	<u>Glycine</u>	<u>Sonication</u>
5	3	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	17	+	+	+	+	+
	23	+	+	+	+	+

Résultats corrects: 100 % pour tous les extraits testés.

10 On peut voir que le groupe C de l'extrait d'antigènes par BOG a la plus faible fréquence de résultats faussement positifs (14 % contre 41 à 77 % pour les autres extraits d'antigènes).

15 Etude de corrélation d'exactitude sur des sérums humains pour des anticorps dirigés contre *H. pylori*, au moyen du groupe C d'extrait d'antigènes par BOG

20 On a recueilli 183 échantillons de sérum et de plasma dans trois cliniques de gastro-entérologie. On a utilisé dans l'essai immuno-enzymatique rapide le groupe C de l'extrait d'antigènes par BOG. Les résultats de l'essai ont été visuellement évalués immédiatement après l'achèvement de l'essai. Les échantillons en désaccord ont été testés par l'essai ELISA sur plaque de microtitrage Biometra, qui détecte les anticorps IgG dirigés contre *H. pylori*.

25 La corrélation de l'essai aux résultats cultureux et histologiques est donnée dans le tableau 3.

Tableau 3

Essai immuno-enzymatique rapide du groupe C par rapport
aux résultats d'examens cultureux/histologiques

		<u>Examens cultureux/histologiques</u>	
		<u>Résultats</u>	<u>Résultats</u>
		<u>positifs</u>	<u>négatifs</u>
	EIA rapide résultat positif	63	15
	EIA rapide résultat négatif	3	102
35	TOTAL:	66	117

Sensibilité du groupe C (% de résultats positifs réels correctement identifiés) = 95 %

Spécificité du groupe C (% de résultats négatifs réels correctement identifiés) = 87 %

5 Exactitude du groupe C (% de résultats corrects) = 90 %

Fiabilité des résultats positifs du groupe C (+) = 81 %

Fiabilité des résultats négatifs du groupe C (-) = 97 %.

10 Les résultats d'échantillons en désaccord ont été confirmés comme positifs ou négatifs eu égard à l'infection, au moyen de l'essai ELISA Biometra (tableau 4).

Tableau 4

Résultats d'essais d'échantillons en désaccord

		Résultat de	Résultat des examens	Résultat de
	<u>Echantillon</u>	<u>l'EIA rapide</u>	<u>cultureaux/histologiques</u>	<u>l'essai ELISA Biometra</u>
15	52	-	+	+
	56	-	+	+
	59	-	+	+
	3	+	-	+
20	5	+	-	+
	32	+	-	+
	46	+	-	+
	50	+	-	+
	62	+	-	+
25	73	+	-	+
	91	+	-	+
	105	+	-	+
	117	+	-	+
	119	+	-	+
30	140	+	-	+
	167	+	-	+
	173	+	-	+
	174	+	-	+

35 Quatorze sur quinze sérums positifs à l'EIA rapide et négatifs aux examens cultureaux/histopathologiques ont été

confirmés positifs dans l'essai ELISA Biometra. Avec ces ajustements, l'essai immuno-enzymatique rapide s'est révélé avoir une sensibilité et une spécificité de 96 et 99 %, respectivement (tableau 5).

5

Tableau 5

Essai immuno-enzymatique rapide du groupe C par rapport aux examens cultureux/histologiques, ajustés pour les résultats de l'essai ELISA

10

Examens cultureux/histologiques

	<u>Résultats positifs</u>	<u>Résultats négatifs</u>
EIA rapide résultat positif	77	1
EIA rapide résultat négatif	3	102
TOTAL:	80	103

15

Sensibilité corrigée du groupe C = 96 %

Spécificité corrigée du groupe C = 99 %

Exactitude corrigée du groupe C = 98 %

PV corrigé du groupe C (+) = 99 %

PV corrigé du groupe C (-) = 97 %.

20

Comparaison d'un extrait d'antigènes "enrichis en uréase" avec le groupe C, eu égard à sa qualification dans la détection d'anticorps dirigés contre *H. pylori* dans des sérums humains

25

On a préparé une composition d'antigènes "enrichis en uréase" (groupe B) comme décrit dans US-A-4 882 271 (Evans et coll.) et on l'a comparée à l'antigène du groupe C "privé d'uréase" eu égard à leurs aptitudes à déceler des anticorps IgG dirigés contre *H. pylori* dans des sérums humains, dans l'essai immuno-enzymatique rapide. Le tableau 6 donne les résultats obtenus avec des échantillons de sérum humain.

30

Tableau 6

Comparaison du groupe B (antigène enrichi en uréase)
avec le groupe C au moyen de l'essai immuno-enzymatique
rapide

5	<u>Sérums H. pylori-négatifs</u>		
	<u>Echantillon</u>	<u>Groupe B (uréase)</u>	<u>Groupe C</u>
	4	+	-
	6	-	-
	7	-	-
10	8	+	-
	9	-	-
	10	+	-
	11	+	+
	13	-	-
15	14	-	-
	15	-	-
	16	-	-
	19	-	-
	21	-	-
20	25	-	-
	63	-	-
	64	-	-

Résultats faussement
positifs, %

25

6

25	<u>Sérums H. pylori-positifs</u>		
	<u>Echantillon</u>	<u>Uréase</u>	<u>Groupe C</u>
	3	+	+
	17	+	+
	18	+	+
30	23	+	+
	26	+	+
	28	+	+
	29	+	+
	30	+	+

35 Résultats corrects, %

100

100

Le tableau 6 montre que l'antigène du groupe C, privé d'uréase, a une plus faible fréquence de résultats faussement positifs que la composition d'Evans enrichie en uréase (6 % par rapport à 25 %, respectivement).

5

Exemple 4

On a comparé quatre extraits différents d'antigènes de H. pylori [groupe A, groupe C (privés d'uréase), extraits de sonication et de glycine] dans un essai ELISA sur plaque de microtitrage, avec les résultats d'examens culturels et his-
10 tologiques sur des échantillons de sérums humains.

Essai de microtitrage immuno-enzymatique d'antigènes de H. pylori

On a revêtu pendant une nuit à 4°C, avec des concentra-
tions optimisées des quatre antigènes, des plaques de micro-
15 titrage à 96 puits à fond plat. Après élimination des solu-
tions d'antigènes, les plaques ont été séchées à l'air et
enveloppées. Pour l'exécution des essais immunologiques, on a
réhydraté les puits, à la température ambiante, avec 300 µl
de solution de lavage pour microtitrage [STP contenant 0,05 %
20 (p/v) de Tween 20 et 0,01 % (p/v) de Thimerosal]. On a
ensuite éliminé le liquide et on a effectué les étapes sub-
séquentes à 25°C. On a introduit dans les puits (100 µl par
puits) des échantillons de sérum dilués par un facteur de 100
avec de la STP contenant de l'ASB, et on les a mis à incuber
25 pendant 30 minutes. Les plaques ont été lavées à cinq
reprises avec 300 µl chaque fois de solution de lavage, et
mises à incuber pendant 30 minutes avec des anticorps
anti-IgG humaine de lapin conjugués à la peroxydase. Les
plaques ont été lavées à nouveau à cinq reprises avec 300 µl
30 chaque fois de solution de lavage, et mises à incuber pendant
15 minutes avec une solution de substrat fraîchement prépa-
rée, constituée de 2,2'-azino-bis(acide 3-éthylbenz-
thiazoline-sulfonique) [sel de diammonium (ABTS)] et de
peroxyde d'hydrogène. On a mis fin aux réactions par addition
35 de 50 µl d'acide oxalique 0,25 M, et on a mesuré l'absorbance

à 410 nm au moyen d'un lecteur de plaque MR 700 (Dynatech Laboratories).

Les résultats donnés dans le tableau 7 montrent que le groupe C, par comparaison avec les autres compositions d'antigènes testées, est supérieur eu égard à sa spécificité et à sa sensibilité dans l'identification de sérums humains H. pylori-négatifs et H. pylori-positifs.

Tableau 7

Comparaison de la spécificité et de la sensibilité d'un essai ELISA par microtitrage pour des anticorps IgG dans des sérums humains, au moyen de compositions distinctes d'antigènes de H. pylori

	<u>Groupe C</u> (n=29)	<u>Groupe A</u> (n=29)	<u>Glycine</u> (n=48)	<u>Sonication</u> (n=33)
15 Spécificité:	93 %	72 %	73 %	64 %
Sensibilité	100 %	100 %	100 %	100 %

Note:

1. n = nombre de sérums H. pylori-négatifs testés, déterminés par examen histo-cytologique.
- 20 2. la spécificité est l'aptitude à déceler correctement des sérums H. pylori-négatifs, comme déterminé par examen histo-cytologique.
3. La sensibilité est l'aptitude à déceler correctement des sérums H. pylori-positifs, comme déterminé par examen
- 25 histo-cytologique.

REVENDICATIONS

1. Composition comprenant des antigènes purifiés, provenant de protéines associées aux cellules de Helicobacter pylori, les antigènes:
 - 5 (a) ayant une masse moléculaire inférieure à environ 200 000 daltons, telle que déterminée par analyse par SDS-PAGE avec réduction; et
 - (b) ayant une activité réduite d'uréase.
2. Composition selon la revendication 1, caractérisée
10 en ce que les antigènes ont une masse moléculaire allant d'environ 16 000 à environ 120 000 daltons, telle que déterminée par analyse par SDS-PAGE avec réduction.
3. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que les protéines associées aux cellules sont obtenues
15 par solubilisation des cellules par mise en suspension dans une solution salée tamponnée au phosphate (STP) contenant un détergent non ionique.
4. Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce que la STP contient 0,1-3,0 % du détergent non ionique
20 n-octyl- β -D-glucopyranoside.
5. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que la STP contient environ 1 % de n-octyl- β -D-glucopyranoside.
6. Composition selon la revendication 5, caractérisée
25 en ce que la solubilisation dure au moins environ 30 minutes.
7. Composition comprenant des antigènes purifiés provenant de protéines associées aux cellules de Helicobacter pylori, la composition étant obtenue par
30 (a) culture de cellules de Helicobacter pylori dans un bouillon additionné de sérum fœtal bovin, et récolte des cellules lorsque la croissance en phase logarithmique a commencé à décliner;

- (b) solubilisation des cellules dans une solution salée tamponnée au phosphate, contenant environ 1 % de n-octyl- β -D-glucopyranoside, pendant au moins environ 30 minutes, pour l'obtention d'une solution de protéines cellulaires;
- 5 (c) dialyse pendant une nuit de la solution de protéines cellulaires contre de la STP, puis centrifugation de la solution à vitesse moyenne, pour l'obtention d'un surnageant;
- (d) injection du surnageant dans une colonne de chromatographie par exclusion de taille ;
- 10 (e) élution de la colonne avec du tampon et collecte des fractions éluées ; et
- (f) réunion des fractions protéiques à faibles masses moléculaires, privées d'uréase, pour l'obtention d'une composition comprenant des antigènes purifiés à partir de protéines associées aux cellules de Helicobacter pylori.
- 15

8 . Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que, dans l'étape (d), la colonne de chromatographie par exclusion due à la taille est une colonne d'exclusion due à la taille 6FF (Pharmacia).

20

9 . Composition selon la revendication 8, caractérisée en ce que la colonne est éluee avec du tampon Tris 50 mM contenant 0,025 % d'azoture de sodium.

25 10. Procédé pour la détection d'infection par Helicobacter pylori dans un échantillon biologique, le procédé comprenant:

- (a) la mise en contact de la composition de la revendication 1 avec l'échantillon, pour la formation d'un complexe d'incubation; et
- 30 (b) l'essai du complexe d'incubation pour la détermination de la présence de complexes anticorps-antigènes indiquant la présence d'infection par Helicobacter pylori.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que, dans l'étape (b), le complexe d'incubation est testé par une méthode choisie parmi un essai immuno-enzymatique, un essai radio-immunologique, la fixation de complément, l'hémagglutination indirecte, l'agglutination de latex, l'es-

35

sai d'écoulement rapide et l'essai d'écoulement latéral.

12. Procédé de détection d'infection par Helicobacter pylori dans un échantillon biologique, le procédé comprenant:

- 5 (a) la mise en contact de la composition de la revendication 7 avec l'échantillon, pour la formation d'un complexe d'incubation; et
- (b) l'essai du complexe d'incubation pour la détermination de la présence de complexes anticorps-antigènes indiquant la présence d'infection par Helicobacter pylori.

10 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que, dans l'étape (b), le complexe d'incubation est testé par une méthode choisie parmi un essai immuno-enzymatique, un essai radio-immunologique, la fixation de complément, l'hémagglutination indirecte, l'agglutination de latex, l'essai d'écoulement rapide et l'essai d'écoulement latéral.

15 14. Procédé pour la détection d'infection par Helicobacter pylori dans un échantillon biologique, le procédé comprenant:

- 20 (a) l'immobilisation et le séchage de la composition de la revendication 1 sur un support solide, pour l'obtention d'un complexe d'antigènes séchés;
 - (b) l'incubation du complexe d'antigènes séchés avec l'échantillon, pour la formation d'un complexe anticorps-antigènes;
 - 25 (c) l'addition au complexe anticorps-antigène d'anticorps anti-IgG humaine conjugués à une enzyme, et l'incubation pour la formation d'un complexe de marquage;
 - (d) l'addition au complexe de marquage d'un substrat pour l'enzyme conjuguée, pour la formation d'un complexe de développement; et
 - 30 (e) le contrôle du complexe de développement pour déceler un changement dans le substrat, pour la détermination de la quantité d'anticorps dirigés contre Helicobacter pylori, présent dans l'échantillon.
- 35

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que, dans l'étape (c), les anticorps anti-IgG humaine sont conjugués à de la peroxydase de raifort.

5 16. Nécessaire pour la détermination de la présence de Helicobacter pylori dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que le nécessaire comprend la composition de la revendication 1.

10 17. Nécessaire pour la détermination de la présence de Helicobacter pylori dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que le nécessaire comprend la composition de la revendication 1 immobilisée sur un support solide.

15 18. Nécessaire pour la détermination de la présence de Helicobacter pylori dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que le nécessaire comprend la composition de la revendication 7.

19. Nécessaire pour la détermination de la présence de Helicobacter pylori dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que le nécessaire comprend la composition de la revendication 7 immobilisée sur un support solide.

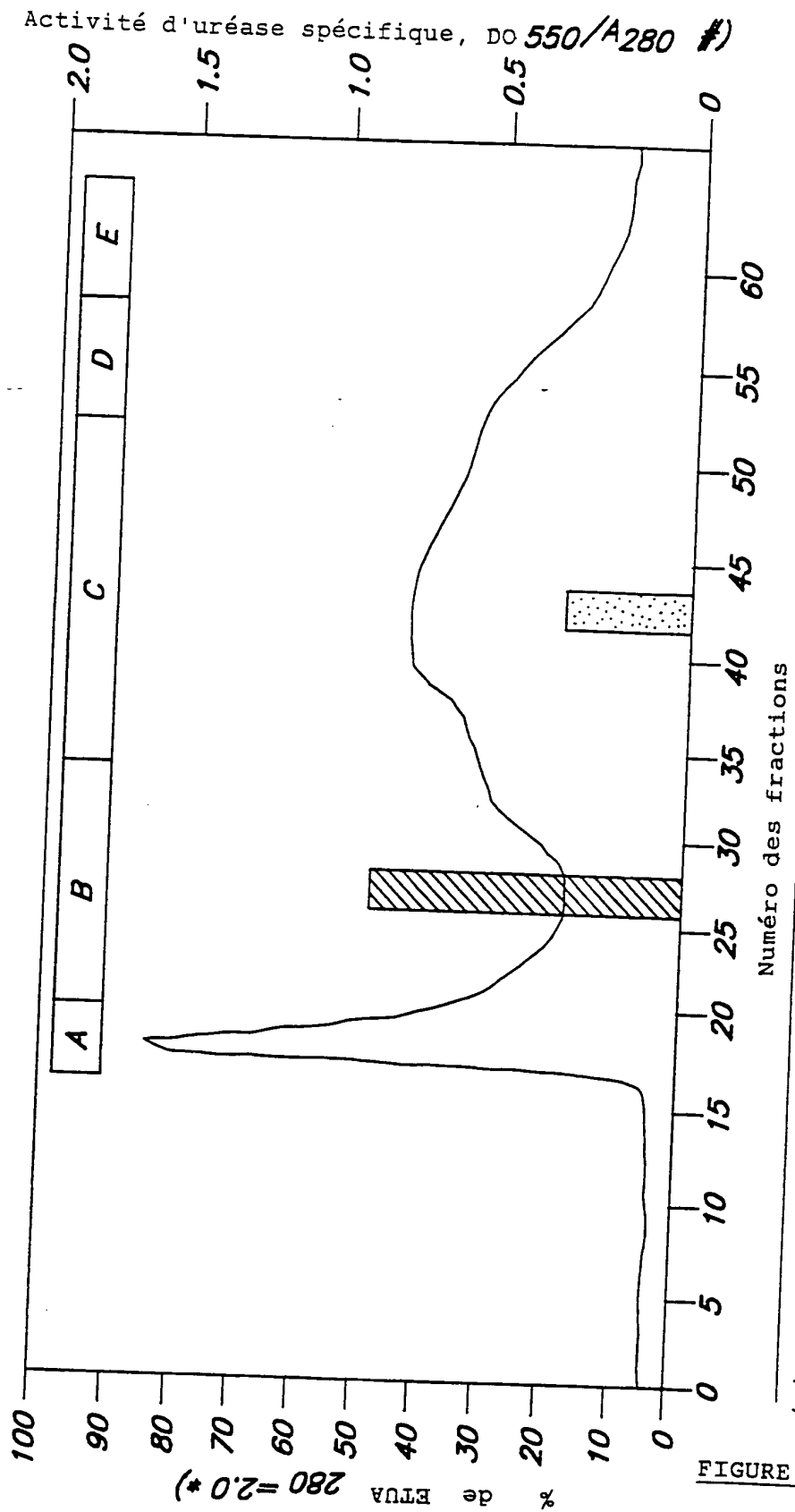
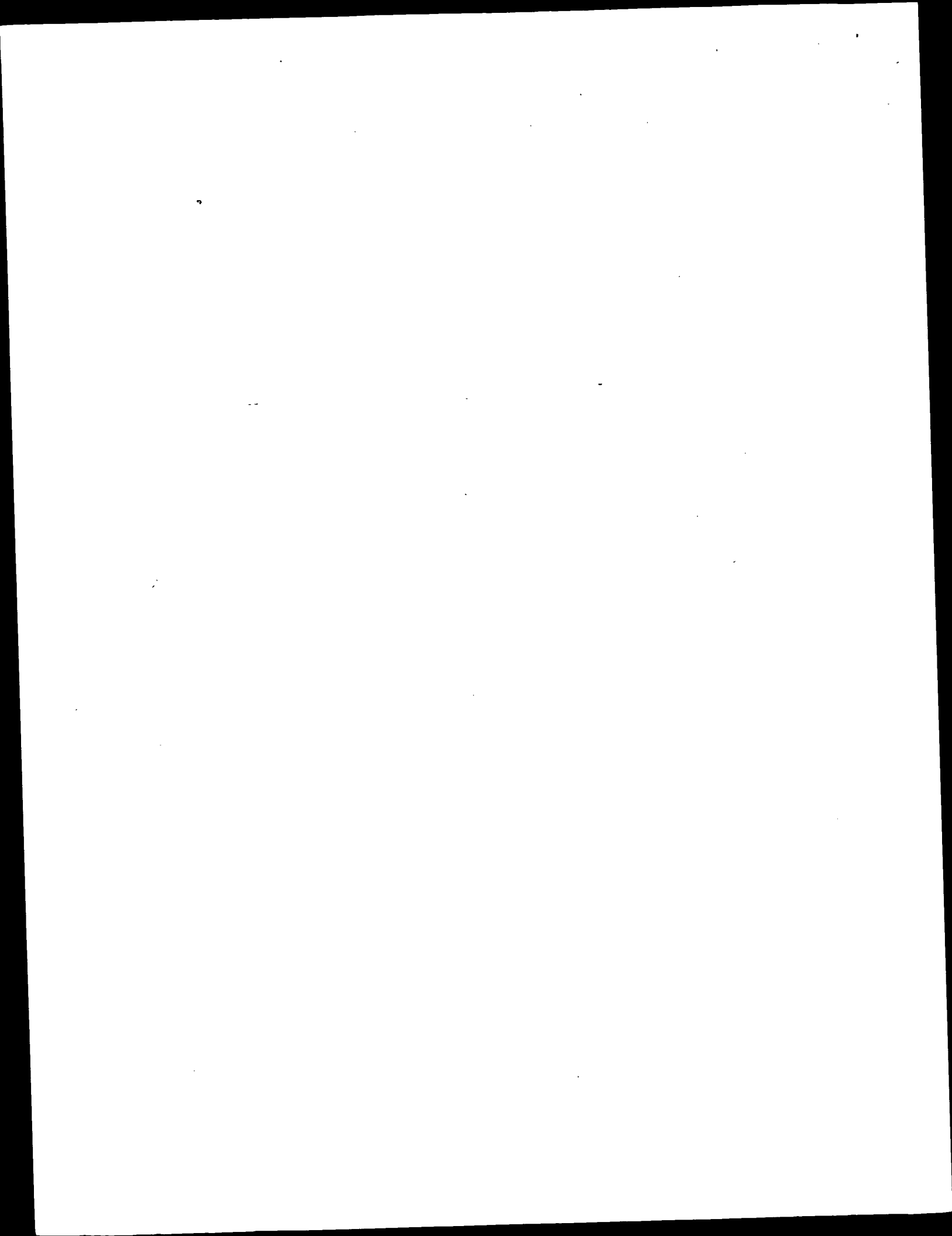


FIGURE 1

(*) Les barres représentent l'activité d'uréase spécifique associée aux groupes indiqués
 (**) Echelle totale d'unités d'absorbance.



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 92/00921

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> CIB 5 C12N15/31; C12P21/08; C12N15/74; A61K39/02 C12N1/21; C12Q1/68 </div>		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C07K ; C12N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ⁹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	No. des revendications visées ¹⁴
X	BULL. ACAD. NATL. MÉD. vol. 175, no. 6, Juin 1991, PARIS, FR pages 791 - 802 A. LABIGNE ET AL. 'Développement d'approches génétiques et moléculaires pour le diagnostic et l'étude du pouvoir pathogène de Helicobacter pylori, agent des maladies inflammatoires gastriques'	1-2, 4, 5-10, 12, 20-33
Y	voir page 796, alinéa 2 -alinéa 3 <div style="text-align: center;">---</div> <div style="text-align: center;">-/--</div>	13, 16, 17, 35, 36
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹¹ Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
05 JANVIER 1993	04.02.93	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	THIELE U.H.	

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 9200921
SA 66301

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 05/01/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0367644	09-05-90	FR-A- 2637612	13-04-90
		WO-A- 9004030	19-04-90
		JP-T- 3501928	09-05-91

WO-A-9109049	27-06-91	None	

EPO FORM P0479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82